AUS DER UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK
FÜR HALS-, NASEN- UND OHRENKRANKE WÜRZBURG
Direktor: Prof. Dr. Walter KLEY

HISTOCHEMISCHE UND MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN TUMOREN DER ZYMBALDRÜSE DER RATTE, INDUZIERT DURCH TRANS-4-DIMETHYLAMINOSTILBEN

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Helmar Schuldenzucker
aus Grassau/Chiemgau

Würzburg, den 29.10.1979

1980

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

AUS DER UNIVERSITÄTSKLINIK UND POLIKLINIK
FÜR HALS-, NASEN- UND OHRENKRANKE WÜRZBURG
Direktor: Prof. Dr. Walter KLEY

HISTOCHEMISCHE UND MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN TUMOREN DER ZYMBALDRÜSE DER RATTE, INDUZIERT DURCH TRANS-4-DIMETHYLAMINOSTILBEN

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der Hohen Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Helmar Schuldenzucker
aus Grassau/Chiemgau

Würzburg, den 29.10.1979

Referent:	Priv. - Doz. Dr. J. F. HERRMANN
Korreferent:	Prof. Dr. W. KLEY
Dekan:	Prof. Dr. K. - H. WULF

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meiner Frau Cathie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 5

II. MATERIAL UND METHODIK 6

III. ERGEBNISSE 12

a) Die Zymbaldrüse der Ratte, topographische Anatomie 12

b) Das normale Enzymmuster der Zymbaldrüse 12

1. Bisherige Ergebnisse 12

2. Die praeneoplastischen Veränderungen, Enzymhistochemie und Morphologie 16

c) Die Tumoren, Enzymhistochemie und Morphologie 18

d) Statistik 23

IV. DISKUSSION 28

a) Histochemische Ergebnisse 28

b) Morphologische Ergebnisse 30

V. ZUSAMMENFASSUNG 32

VI. LITERATURVERZEICHNIS 33

VII. LEBENSLAUF 40

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0144

I. EINLEITUNG

A. Haddow und Mitarbeiter wiesen 1948 erstmals die karzinogene Wirksamkeit des trans-4-Dimethylaminostilben (trans-4-DAS) nach. Dabei ergab sich in experimentellen Untersuchungen an Ratten, daß die Wirkung dieser Substanz speziell auf die Zymbaldrüse bzw. auf den Gehörgang der Tiere gerichtet war.
Maligne Tumoren konnten an den epithelialen Geweben dieser Region induziert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die mit trans-4-Dimethylaminostilben an Ratten erzeugten Neoplasien histologisch und histochemisch zu untersuchen, um Abweichungen in den Enzymmustern und in den Stoffwechselleistungen neoplastischer Zellen gegenüber normalen Talgzellen zu erfassen und die Herkunft der Tumoren aus praeneoplastischen Veränderungen möglicherweise analysieren zu können.

F. K. Werner beschrieb die den Neoplasien vorausgehenden praeneoplastischen Veränderungen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse werden zum besseren Verständnis dieser vorliegenden Arbeit deshalb am Anfang des Abschnitts "Ergebnisse" kurz abgehandelt.

II. MATERIAL UND METHODIK

In den Untersuchungen wurden 300 männliche Wistarratten mit einem Ausgangsgewicht von ca. 200 Gramm genommen. Den Tieren wurde das Karzinogen, eingebacken in speziellem Brotteig (Beschreibung siehe unten), in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht/Tag verabreicht. Die tägliche Gabe erfolgte bis zum 170. Versuchstag. Die maximale Gesamtdosis betrug also 170 mg/kg Körpergewicht. Trinkwasser stand ad libitum zur Verfügung. Nach Absetzen des Karzinogens wurde Altromin-Standard-Futter gegeben. Die Tierhaltung erfolgte frei von pathogenen Keimen im klimatisierten Tierstall bei einer Temperatur von 20 - 22°C in Makrolonkäfigen.

Zusammensetzung der Standard-Diät in Brotform

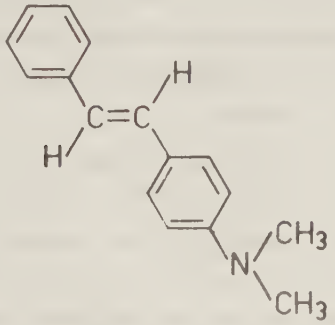
(Druckrey, H., D. Schmähl und W. Dischler, 1962)

Mehl	930 g
Zucker	200 g
Salzgemisch	30 g
Milchpulver	50 g
Lebertran	50 g
Speiseöl	50 g
Malzextrakte	100 g
Nährhefe	50 g
Hefe	40 g
Wasser	300 g.

Beschreibung des Karzinogens

Trans-4-Dimethylaminostilben ist eine blaß-gelbliche kristalline Substanz. Sie ist bei neutraler Reaktion in Wasser praktisch unlöslich, aber leicht löslich in organischen Lösungsmitteln und in Öl. Der Schmelzpunkt liegt bei 149 - 150°C.

Tötung und Untersuchung der Tiere wurden vom 120. - 410. Tag nach Beginn der Kanzerisierung durchgeführt. Die Tötung erfolgte jeweils am Morgen um 7 Uhr durch Nackenschlag. Täglich konnten dabei 1 - 3 Tiere aufgearbeitet werden.

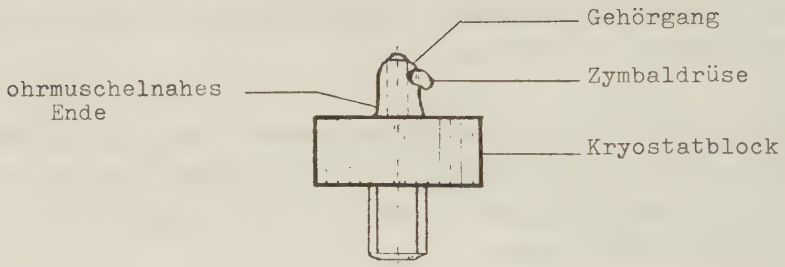


trans-4-Dimethylaminostilben

Die Präparation der Zymbaldrüse

Mit einem Scherenschlag wurde dorsal des Ohrenansatzes ein Schnitt gelegt, der äußere Gehörgang vom benachbarten Gewebe vorsichtig freipräpariert und am Übergang in den knöchernen Anteil abgetrennt. Die an der Gehörgangswand gelegene Zymbaldrüse wurde mit dem gesamten äußeren Gehörgang herausgenommen. Um ein Ablösen des Epithels beim Schneiden im Kryostaten zu vermeiden, wurde der Gehörgang mit einem Stück aus der Halsmuskulatur ausgefüllt. Der Gehör-

gang wurde mit dem ohrmuschelnahen Ende auf einen Kryostatblock so aufgestellt, daß die Achse der Lichtung parallel zur Achse des Blocks stand.



Anschließend wurde das Gewebe mit Kohlensäureschnee tiefgefroren und im Kryostaten in Serienschnitte von 4 µ Dicke geschnitten. Von jedem Block wurden 9 Stufen mit jeweils 9 fortlaufenden Serien angefertigt, also insgesamt 81 Schnitte pro Tier.

Für die enzymhistochemische Untersuchung wurden 7 Schnitte verwendet. Der erste und letzte Schnitt einer Stufe wurde für die morphologische Untersuchung mit Hämatoxilin-Eosin angefärbt. Ab Tier 285 wurden zusätzlich Sudan-III-Färbungen nach F. Daddi (1968) hergestellt, um abzuklären, inwieweit die Zellen in neoplastischen Veränderungen noch die Fähigkeit besitzen Talg zu produzieren.

Talg = Sudan-positiv

Horn = Sudan-negativ

In der folgenden Tabelle werden die histochemischen Enzymnachweisreaktionen an unfixierten Kryostatschnitten aufgeführt. Die verwendeten Abkürzungen sind ebenfalls angegeben:

Enzyme	Autoren		Abkürzungen
HYDROLASEN			
1. Phosphatasen			
Alkalische Phosphatase	Stutte	1967	aPh
Saure Phosphatase	Gössner	1958	sPh
Adenosintriphosphatase	Wachstein und Meisel	1957	ATP
2. Esterasen			
5-Bromindoxylacetatesterase	Holt, Withers	1952	5-Bi
α-Naphthylacetatesterase	Seligmann u. Mitarbeiter	1949	α-Ne
3. Glykosidasen			
ß-Glukuronidase	Rath u. Otto	1966	ß-Gluk
OXYDOREDUKTASEN			
Nicotinamidadenindinucleotid-H-Diaphorase	Scarpelli, Hess u. Pearse	1958	NADH
Cytochromoxydase	Nachlas u. Mitarbeiter	1958	CytOx
Laktatdehydrogenase	Grzycki u. Rzeszowska	1967	LDH
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	Rudolp u. Klein	1964	G-6-PDH
Succinatdehydrogenase	Rosa[illegible]. Tsou	1961	SDH

Zusätzlich führten wir Glykogennachweise (Gly), mit Fixierung nach Neukirch (1909) und Färbung nach Best (1906) durch.

Das folgende Schema gibt die Reihenfolge der Enzymnachweise an: (s. Seite 11)

Stufe	I	II	III	IV	V	VIII	VI	VII	IX
Serie	1 HE	10	19	28	37	64	46 HE	55 HE	73 HE
	2 aPh	11	20	29	38	65	47 α-NE	56 aPh	74 ß-Gluc
	3 5-BI	12	21	30	39	66	48 LDH	57 Gly	75 aPh
	4 LDH	13	22	31	40	671	49 aPh	58 NADH	76 ATP
	5 Gly	14	23	32	41	68	50 Gly	60 5-BI	77 CytOx
	6 aPh	15	24	33	42	69	51 G-6-PDH	60 LDH	78 5-BI
	7 NADH	16	25	34	43	70	52 5-BI	61 aPh	79 NADH
	8 5-BI	17	26	35	44	71	53 aPh	62 G-6-PDH	80 aPh
	9 HE	18	27	36	45	72	54 HE	63 HE	81 HE

III. ERGEBNISSE

a) DIE ZYMBALDRÜSE DER RATTE, TOPOGRAPHISCHE ANATOMIE

Die Zymbaldrüse der Ratte wurde erstmals von W. E. Zymbal (1933) und C. Zawisch-Ossenitz (1933) beschrieben. Sie ist stecknadelkopfgroß (3 - 4 mm im Durchmesser), von weißlich-gelber Farbe und kugelig bis ovaler Form. Sie liegt ventral des äußeren knorpeligen Gehörgangs am Übergang zu seinem knöchernen Anteil. Diese zusammengesetzte Drüse besitzt 3 - 4 Lobi, deren Ausführungsgänge sich zu einem Hauptausführungsgang vereinigen, welcher in die ventrale äußere Gehörgangswand mündet. Das Lumen der Ausführungsgänge und des Hauptausführungsgangs ist wie der Gehörgang mit ein bis zweischichtigem, schwach verhornendem Plattenepithel ausgekleidet. Außerdem finden sich in der Gehörgangswand zahlreiche Haare und kleinere Talgdrüsen, die in einen Haarbalg oder frei in das Gehörgangslumen münden.

b) DAS NORMALE ENZYMMUSTER DER ZYMBALDRÜSE

1. Bisherige Ergebnisse

In der folgenden Tabelle (s. S. 13) wird das normale Enzymmuster der Zymbaldrüse erläutert.

Enzymhistochemische Nachweise liefern grundsätzlich keine Aussage über die wirkliche Stoffwechselrate, sondern zeigen lediglich potentielle Stoffwechselleistungen an (Braun-Falco, 1961). Unter Berücksichti-

Enzym	Aktivität in der Zymbaldrüse	Farbe des Reaktionsniederschlags
OXYDOREDUKTASEN		
NADH-Diaphorase	+	blau-schwarze Formazankristalle
Laktatdehydrogenase	+	feine blau-schwarze Granula
Succinatdehydrogenase	(+)	brauner Niederschlag
Cytochromoxidase	+	schwach-rote Granula
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	+	braun-schwarzer Niederschlag
HYDROLASEN		
1. Phosphatasen		
Alkalische Phosphatase	-	rosa bis roter Niederschlag
Saure Phosphatase	(+)	blasser roter Niederschlag
Adenosintriphosphatase	+	braunschwarze Granula
2. Esterasen		
5-Bromindoxylacetatesterase	+	indigoblauer Niederschlag
α-Naphthylacetatesterase	+	schwarze Granula
3. Glykosidasen		
ß-Glucuronidase	(+)	dunkelbrauner Niederschlag
Glykogen	-	rötliche Granula

\- = kein Reaktionsniederschlag
(+) = schwacher Niederschlag
\+ = deutlich sichtbarer Reaktionsniederschlag

gung dieser Tatsache kann aufgrund der Intensität des Reaktionsniederschlags also keine quantitative Angabe über das Enzym gemacht werden.

Das Verteilungsmuster der Reaktionsniederschläge bei den histochemischen Enzym-Nachweisreaktionen

Die Lactatdehydrogenase (LDH) entfaltet ihre stärkste Aktivität in den generativen Zellen der Talgdrüsenacini. Die Granula liegen dicht und gleichmäßig verteilt, oft sogar zusammenfließend, im Zytoplasma. Am Zellkern, insbesondere der Plattenepithelzellen, zeigen die Granula eine perinukleäre, polförmige Anordnung. Die Aktivität nimmt mit zunehmender Differenzierung der Zellen ab.

Die NADH-Diaphorase (NADH) weist annähernd gleiche Verteilung wie die LDH auf. An der Zellkernmembran ist der Niederschlag jedoch nur perinukleär und gleichmäßig verteilt.

Die Succinatdehydrogenase (SDH) entfaltet in allen Talgdrüsen nur geringe Aktivität. Im Zytoplasma sind nur vereinzelt Niederschlagsgranula zu beobachten, die dichteste Verteilung liegt perinukleär um die Zellkerne der Plattenepithelzellen.

Die Cytochromoxidase (CytOx) bildet in den Basal- und Suprabasalzellen der Drüse einen schwachen Niederschlag. In der übrigen Talgdrüse wird gelegentlich ein blasser Niederschlag angetroffen.

Die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) entspricht in ihrem Verhalten der Cytochromoxydase. Jedoch ist der Niederschlag etwas kräftiger ausgebildet.

Die alkalische Phosphatase (aPh) ist im normalen Epithel der Zymbaldrüse und des Gehörganges nicht nachzuweisen. Nur die Kapillaren in den bindegewebigen Septen zeigen positive Reaktionen.

Die saure Phosphatase (sPh) gibt in den azino-peripheren Zellen einen sehr schwachen Reaktionsniederschlag, der an der Zellmembran nach azino-zentral hin ansteigt. Das Zytoplasma der Talgzellen mit den darin eingeschlossenen Talgklümpchen erscheint schwach angefärbt. Eine Reaktion hoher Intensität zeigt die Zellmembran der Talgzellen.

Der Reaktionsniederschlag der Adenosintriphosphatase (ATP) ist in den azino-peripheren Drüsenzellen schwach, und nimmt mit zunehmender Differenzierung nach azino-zentral ab.

Die 5-Bromindoxylacetatesterase (5-BI) ist ein Leitenzym der Zymbaldrüse. Ihre Aktivität erstreckt sich über das gesamte Drüsenparenchym, mit diffus verteiltem Niederschlag im Zytoplasma der Talgzellen.

Das Enzymverteilungsmuster der α-Naphthylacetatesterase (α-NE) gleicht im Nachweis dem der 5-BI, ist jedoch kein charakteristisches Enzym der Zymbaldrüse.

Die ß-Glucuronidase (ß-Gluc) ist mit schwachem Reaktionsniederschlag gleichmäßig über das Zytoplasma der Talgdrüsenzellen verteilt.

Glykogen (Glyk) ist weder in der normalen Zymbaldrüse noch im Gehörgangsepithel nachweisbar.

2. Die praeneoplastischen Veränderungen

Von den 300 Tieren wurden insgesamt 24 300 Schnitte angefertigt und ausgewertet. Bei den Untersuchungen der praeneoplastischen Veränderungen der Karzinogenese konnten zwei Formen der Zelltransformation unterschieden werden:

1. Die direkte Karzinogenese
2. Die Hyperplasio-Karzinogenese, bei der die Zelltransformation gleichzeitig mit der Entwicklung einer Hyperplasie einhergeht.

Die Zelltransformation zeigte bei beiden Formen denselben, histochemisch definierbaren, stadienhaften Verlauf. Zunächst wird am Beispiel der direkten Karzinogenese der Stadienablauf geschildert:

Stadium I

In umschriebenen Bezirken der Zymbaldrüse tritt am morphologisch unveränderten Epithel als erste histochemisch faßbare Veränderungen eine zunehmende Aktivität der alkalischen Phosphatase auf, die sich zunächst auf den Bereich der äußeren Zellmembran beschränkt, später aber im gesamten Cytoplasma nachweisbar wird. Das übrige Enzymmuster zeigt keine Veränderungen.

Stadium II a

In identischen Drüsenbezirken (mit positiver aPh-Aktivität) kommt es zu einer starken Abschwächung der Aktivität der 5-BI, der CytOx, α-NE und der G-6-PDH. Morphologische Veränderungen zeigen sich in der Regel nicht.

Stadium II b

In diesem Stadium fallen LDH und NADH aus. Der Reaktionsnie-

derschlag der aPh hat im gesamten Zytoplasma an Intensität zugenommen.

Erste morphologische Veränderungen können festgestellt werden. Die Zellkerne zeigen Hyperchromasie und die Kern-Plasma-Relation hat sich zu gunsten der Kerne verschoben. Das Zytoplasma wird zunehmend optisch leer.

Stadium III

Die Dauer dieses Stadiums ist durch eine nachweisbare intrazytoplasmatische Glykogenakkumulation charakterisiert. Während dieses Stadiums fällt die Aktivität der aPh wieder aus.

Stadium IV

Wichtigstes Merkmal dieser Phase ist das Verschwinden der Glykogenose. Die Aktivitäten der ATPase und der SDH steigen an. Die transformierenden Zellen werden zunehmend basophil und ähneln den Basalzellen der Epidermis.

Zwischen allen aufeinanderfolgenden Stadien konnten Übergänge beobachtet werden. Die Stadien traten chronologisch geordnet auf. Beides spricht für die Richtigkeit des Schemas.

Die Hyperplasio-Karzinogenese zeigt denselben stadienhaften Ablauf. An die Transformation ist dabei die Entstehung einer Hyperplasie gekoppelt. Hyperlasien ohne in Gang befindliche Transformation konnten nicht beobachtet werden. Es entwickelten sich einfache und papilläre Hyperlasien.

Im weiteren Verlauf der Hyperlasio-Karzinogenese beobachten wir beim Übergang in das Stadium IV das Auftreten einer azino-peripher gelegenen Hornlamelle. Zugleich entstanden zentro-azinäre Nekrosen. Dies könnte dafür sprechen, daß durch die Bildung der Hornlamelle die Dif-

fusionsernährung der suprabasalen Talgzellen unterbrochen wird. Daraus entwickelten sich Cysten mit einer Wand aus ein bis zweischichtigen verhorntem Plattenepithel. Je nach Herkunft aus einfachen oder papillären Hyperlasien waren die Cysten glattwandig oder zeigten papillären Aufbau. Nur wenige Hyperplasien erreichten das Stadium IV primär ohne die Entwicklung einer Plattenepithelmetaplasie.

In den Arbeiten von A. Schauer und E. Kunze (1968), E. Kunze und A. Schauer (1971), I. Herrmann und A. Schauer (1972 u. 1973) und I. F. Herrmann und W. Kamke (1974) wurden Enzymdefekte bzw. das Neuauftreten von Enzymen in chemisch induzierten praeneoplastischen Veränderungen an verschiedenen Organen beschrieben.

c) DIE TUMOREN

Durch die histochemischen Veränderungen an den Tumorzellen lassen sich bedingt Rückschlüsse auf das Ausgangsstadium der Tumorenentwicklung ziehen. Durch die Versuchsanordnung haben wir die Möglichkeit sämtliche durchlaufene Stadien zu erkennen.

Übergänge in Karzinome fanden sich im Stadium IV der direkten Karzinogenese, in Hyperplasien der Stadien I - IV, IV und in Cysten des Stadiums IV der Hyperplasio-Karzinogenese.

Die proliferierenden Karzinome brachen von der Zymbaldrüse aus in das praeaurikuläre Gewebe in die fossa retromandibularis ein. Sie zeigten als exulzerierende, blutig imbibierte Geschwülste eine speckig-derbe

bis markig-filzige Konsistenz.

Als erste Stufen der neoplastischen Proliferation traten zunächst Carcinomata in situ und Mikrokarzinome auf. Das Carcinoma in situ zeigte im Vergleich zu den Herden vom Stadium IV (direkte Karzinogenese) gesteigert atypisches Epithel sowie wechselnd ausgeprägte Hyperchro asie und Polymorphie der Zellkerne, bisweilen plump in das Stroma vorwachsende Zellzapfen und vermehrte Mitosen.

Das Mikrokarzinom zeichnet sich zusätzlich durch einzelne in die Umgebung abtropfende, atypische Zellen oder feine Zellstränge als Zeichen des beginnenden infiltrierenden Wachstums aus. Zugleich mit dem invasiven Wachstum nahm die Aktivität der sauren Phosphatase an den Membranen der Talgzellen zu. Das Muster der übrigen Enzyme veränderte sich gegenüber dem Stadium IV nicht.

Bei den proliferierenden Karzinomen konnten folgende Differenzierungsformen beobachtet werden. Sie sind nach ihrer prozentualen Verteilung aufgezählt:

1. Verhornende Plattenepithelkarzinome
2) Mixed-type-Karzinome
4) Undifferenzierte Karzinome
4) Nicht verhornende Plattenepithelkarzinome
5) Nicht verhornende kleinzellige (Basalzell-) Karzinome
6) Adenokarzinome
7) Solides Talgzellkarzinom

Das verhornende Plattenepithelkarzinom entwickelt sich immer aus Zellen des Stadiums IV oder aus Cysten entsprechend dem Stadium IV der Hyperplasio-Karzinogenese, und aus Plattenepithelmetaplasien des Stadiums IV bei der direkten Karzinogenese. Gelegentlich auch aus intraazinären papillären Basalzellproliferationen. Häufiger war die Ent-

wicklung aus ein- bis zweischichtigem Cystenwandepithel über eine papilläre Hyperplasie bei der Hyperplasio-Karzinogenese zu beobachten. Diese Tumoren entstanden immer aus Zellen des Stadiums IV.

Morphologisch bot sich ein typisches Bild: Infiltrierend wachsende Plattenepithelstränge, undeutlich begrenzte Tumorzellen mit hyperchromatischen, mäßig polymorphen Kernen und zahlreichen zwiebelschalenartig geschichteten Hornperlen in den Tumorsträngen. In einzelnen Tumorabschnitten werden gelegentlich zentrale Nekrosen angetroffen, deren Lichtung mit Detritus und hämosiderinbeladenen Zellen ausgefüllt sind. Die Tumorzellen sind gut ausdifferenziert und reich an Zytoplasma.
Die Plattenepithelkarzinome wiesen meist keine histochemisch nachweisbare ATPase- und Succinatdehydrogenase-Aktivität auf. Diese Enzyme fielen mit Eintritt des invasiven Wachstums aus. In der Regel wurde das Enzymverteilungsmuster des Stadiums IV angetroffen.

Trotz der guten Ausdifferenzierung der Tumorzellen enthielten einige Zellen Sudan-III-positive Einschlüsse im Zytoplasma. Diese wichtige Tatsache weist auf das Ursprungsgewebe des Tumors hin. Die Fähigkeit zur Talgproduktion scheint also bei der malignen Entartung nicht bei allen Zellen verlorengegangen, sondern nur gedrosselt zu sein.

Das Mixed-type-Karzinom

Die Entwicklung der Mixed-Type-Karzinome nahm ihren Ausgang von praeneoplastischen Veränderungen der Hyperplasio-Karzinogenese. Nach unseren Beobachtungen entstanden sie aus intraazinären papillären Hyperplasien der Stadien I - IV. Die Häufigkeit dieser Tumorform nahm im Verlauf der Untersuchungen beständig ab.

Das sog. Mixed-type-Karzinom zeigte papillär wachsende Tumorzapfen, bestehend aus basalzellwertigen, peripher gelegenen Zellen und zentral atypischen Talgzellen mit kleinen dunklen Kernen und wabigen Zytoplasma. Ein intrazystäres Karzinom entstand aus einer in die Zyste hineinragenden Hyperplasie einer papillären Zellproliferation. Extrazystär und intrazystär entwickelte sich das Karzinom aus einer hyperplastischen Zystenwand.

Die Enzymnachweise fielen in der verbreiterten Basalzellschicht der papillären Tumorzapfen durchwegs negativ aus, gelegentlich traf man aber auch Zellbezirke des Stadiums IV an. Wohingegen die atypischen Talgzellen ein Enzymmuster der Stadien I - III aufwiesen.

Der Talgnachweis mit Sudan-III machte deutlich, daß die Talgproduktion in diesen Zellen erheblich gestört ist: Nur wenige, kleine Sudan-III-positive Talgklümpchen konnten noch nachgewiesen werden.

Das undifferenzierte Karzinom

Die solide gebauten Tumoren hatten ausgeprägte polymorphe Zellen und hyperchromatische Zellkerne. Die Kern-Plasma-Relation war erheblich zugunsten der Kerne verschoben. Zahlenmäßig stieg dieser Karzinomtyp gegen Ende der Versuche stark an.

Histochemisch fiel die erhöhte Aktivität der sauren Phosphatase auf und gelegentlich die erhöhte ATPase-Aktivität. Aus welchen praeneoplastischen Stadien sich das undifferenzierte Karzinom entwickelt, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Die Vermutung liegt aber nahe, daß es sich um ein frühes Stadium IV handelt, da eine ATPase-Aktivität beobachtet wurde. Eine Entwicklung aus Stadium III muß wegen der dichten Lagerung der Zellen diskutiert werden. Die Sudan-III-Reaktion fiel negativ aus. Die Genese dieses Tumors läßt also nicht auf die Talgdrüsen schließen.

Das nicht verhornende Plattenepithelkarzinom konnte nur in geringer Zahl beobachtet werden. Diese Tumoren entwickelten sich über die direkte Karzinogenese oder über die Hyperplasio-Karzinogenese aus papillären Plattenepithelhyperplasien einer Zystenwand des Stadiums IV. Morphologisch und histochemisch entsprach das nicht verhornende Plattenepithelkarzinom dem verhornenden Typ. Der Talgnachweis mit Sudan-III fiel negativ aus.

Das nicht verhornende kleinzellige (Basalzell-) Karzinom

Charakteristisch für die Morphologie war das basophile Zytoplasma, das in geringer Ausdehnung kleine, hyperchromatische, dichtgedrängte Kerne umgab. Eine klare Abgrenzung durch die äußere Zellmembran war nicht gegeben. Das kleinzellige (Basalzell-) Karzinom zählt zu den selten beobachteten Tumoren.

Der Enzymnachweis zeichnete sich durch eine hohe ATPase-Aktivität der Zellen des frühen Stadiums IV aus. Bisweilen waren intrazytoplasmatische Glykogengranula in den Tumorzellen des kleinzelligen Karzinoms entsprechend dem Stadium III nachzuweisen.

Das kleinzellige Karzinom entstand aus Zellen des Stadiums III - IV oder aus Bezirken des frühen Stadiums IV bei der direkten Karzinogenese. In wenigen Fällen entwickelt es sich aus der Zystenwand über die papilläre Hyperplasie. Der Talgnachweis mit Sudan-III war negativ.

Das Adenokarzinom

Das Adenokarzinom konnte nur selten beobachtet werden. Es entwickelt sich aus dem Stadium IV der direkten Karzinogenese.

Die Zellen dieses Tumors sind papillär, drüsenähnlich oder rosettenförmig gruppiert und erinnern meist an atypische Basalzellen.

Das Enzymmuster der Zellen wies eine hohe ATPase- und SDH-Akti-

vität auf. Diese nachweisbaren Enzymaktivitäten könnten ein Anhalt dafür sein, daß die Entwicklung dieser Tumoren ihren Ausgang im Stadium IV nahm.

Das solide Talgzellkarzinom

In einem Fall konnte ein solides Talgzellkarzinom diagnostiziert werden.
Die atypischen Talgzellen entsprachen den talgzellwertigen Zellen der Mixed-type-Karzinome.
Histochemisch wurden die Zellen des Talgzellkarzinoms den Stadien IIa - IIb´ zugeordnet.

d) STATISTIK

Die statistische Auswertung der 124 malignen Tumoren (Abb. I) ergab 58 verhornende Plattenepithelkarzinome, 33 Mixed-type-Karzinome, 11 undifferenzierte Karzinome, 10 nicht verhornende Plattenepithelkarzinome, 7 nicht verhornende kleinzellige (Basalzell-) Karzinome, 4 Adenokarzinome und 1 solides Talgzellkarzinom.

Bei der Tumorenentwicklung bezogen auf die Induktionszeit (Abb. II, s. S. 25) ist ein Anstieg der Häufigkeit der Tumorentwicklung zwischen dem 190. und 250. Tag zu bemerken. Bis zum 310. Tag verläuft sie nahezu parallel zur Zeitachse, steigt dann erneut steil an und erreicht um den 370. Tag das Maximum. Nach diesem Zeitpunkt fällt sie stetig ab. Interessant zu erwähnen ist noch, daß ab dem 350. Tag gelegentlich bis zu 5 Tumoren an einem Tier gefunden wurden. Um den 370. Tag wurden vereinzelt sogar bis zu 20 Mikrokarzinome pro untersuchtes Tier

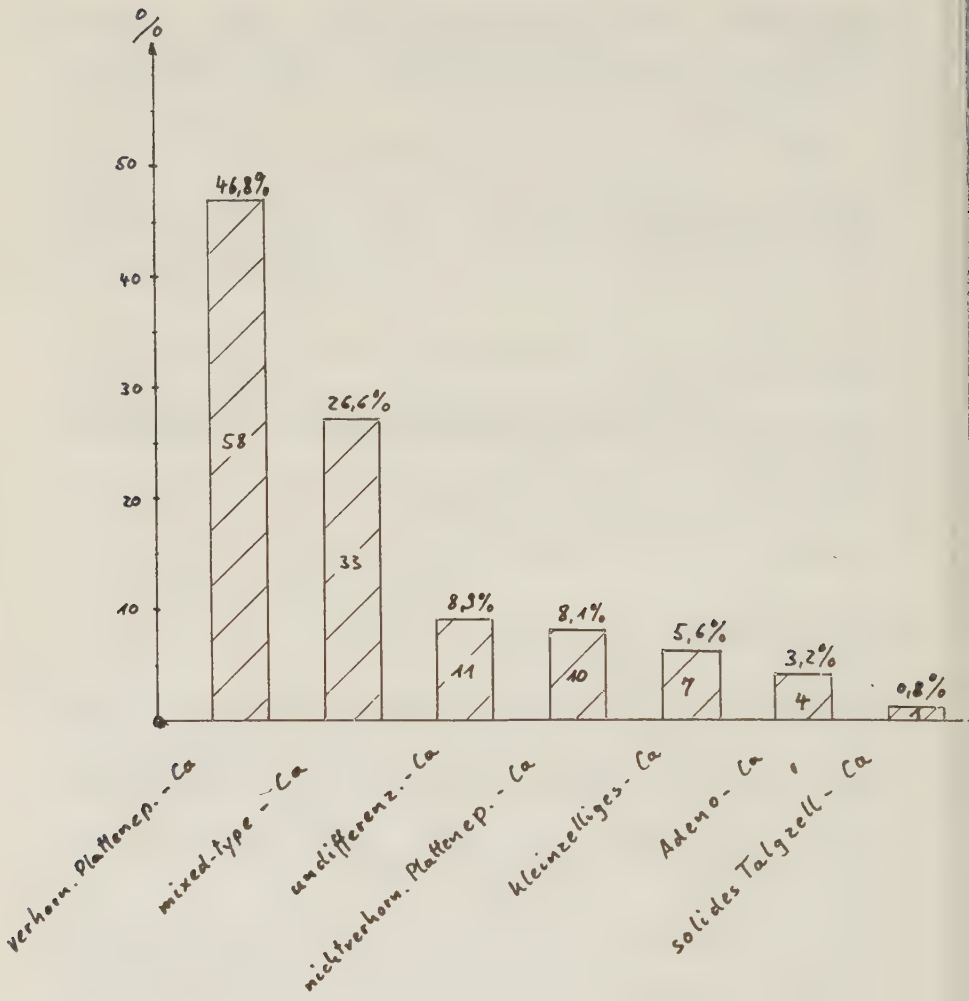


ABBILDUNG I

Einteilung der 124 gefundenen Tumoren nach der Häufigkeit ihres Auftretens

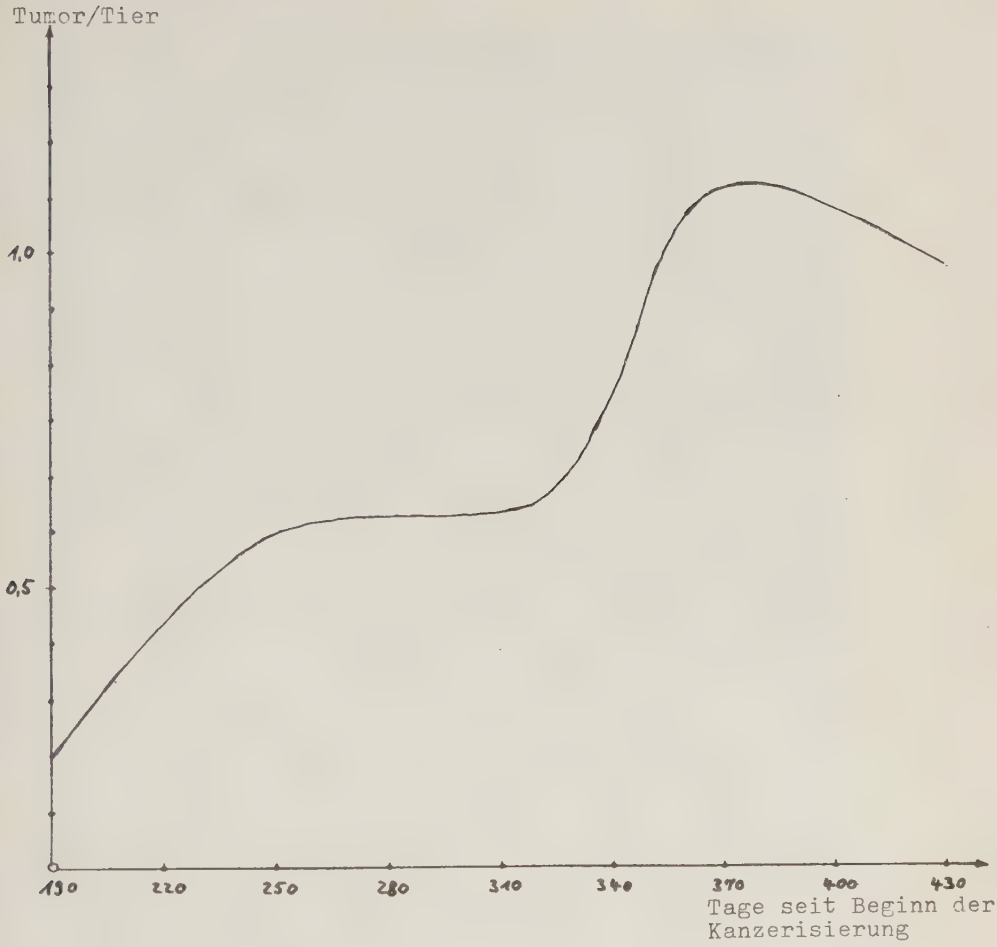


ABBILDUNG II

Tumoren, bezogen auf die Induktionszeit

(um einen kontinuierlichen Verlauf der Kurve zu erhalten wurden die Werte gemittelt)

gezählt. Diese Tumorhäufung erklärt das Überschreiten des 1,0-Wertes auf der Tumor/Tier-Ordinate um den 350. Tag.

Verfolgt man das Auftreten der einzelnen Tumorarten über die gesamte Versuchszeit hinweg, so fällt auf, daß zuerst fast nur Mixed-type-Karzinome entstanden, mit dem Maximum (Abb. III, s. S. 27) der Häufigkeit um den 300. Tag nach Beginn der Kanzerisierung. Um den 500. Tag tritt dieser Tumor nur noch selten auf.

Das verhornende Plattenepithelkarzinom nimmt in seiner Zahl langsam aber stetig zu, um den 360. Tag erreicht es erst die prozentuale Rate des Mixed-type-Karzinoms (ca. 40 %). Bis zum 500. Tag hat sich der Anteil der Plattenepithelkarzinome auf 55 % vergrößert.

Das undifferenzierte Karzinom, das in den Anfangsstadien der Kanzerisierung kaum in Erscheinung getreten ist, nimmt um den 460. Tag an Häufigkeit zu. Um den 550. Tag ist sein Anteil, im Vergleich zu den gesamten Neoplasien, auf 40 % angestiegen.

Die übrigen Tumoren wurden wegen der geringen Fallzahlen für die statistische Wertung nicht berücksichtigt.

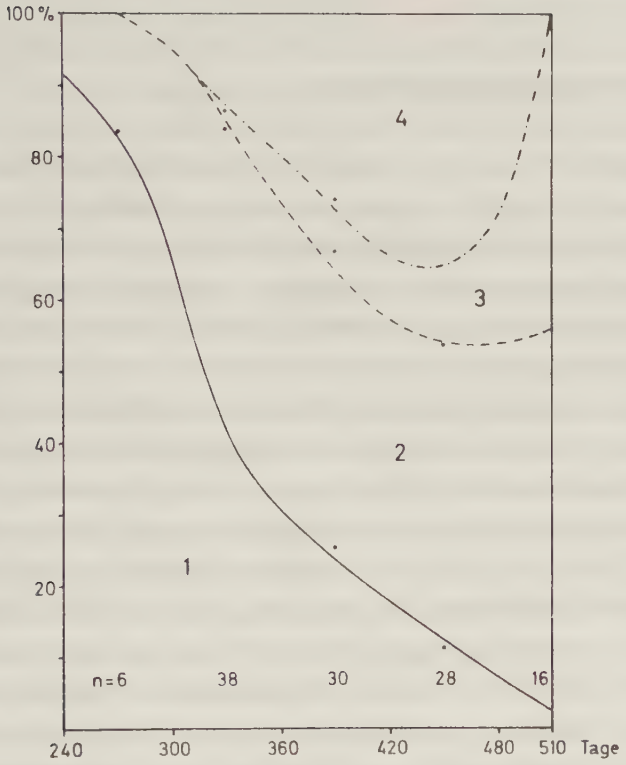


ABBILDUNG III

Verteilung der Karzinome unterschiedlicher Differenzierungen in Abhängigkeit von der Zeit seit Beginn der Kanzerisierung

1 Mixed-type-Karzinome

2 verhornende Plattenepithelkarzinome

3 undifferenzierte Karzinome

4 sonstige Tumoren

IV. DISKUSSION

a) HISTOCHEMISCHE ERGEBNISSE

Nach unseren Erkenntnissen nimmt die neoplastische Proliferation sowohl über die direkte Karzinogenese wie vom Stadium IV der Hyperplasio-Karzinogenese ihren Ausgang. In normalen Geweben der Zymbaldrüse ist die alkalische Phosphatase, außer an den Kapillarwänden, im Bereich der bindegewebigen Septen nicht vorhanden. Im Tumorgewebe manifestierte sich ein histochemisch nicht mehr nachweisbarer Aktivitätsverlust der alkalischen Phosphatase. Dies steht in Übereinstimmung mit Matsumara (1966), der die Speicheldrüsen von Mäusen mit implantierten DMBA-Pellets kanzerisierte. Die während der initialen Phase seines Versuchs beobachtete intensive Aktivität der alkalischen Phosphatase vergleicht er mit der Aktivität im Granulationsgewebe bei der Wundheilung und führte die Induktion deshalb auf den chirurgischen Eingriff zurück. Die Untersuchungen von I. F. Herrmann und W. Kamke (1974) über Epithelregeneration nach Läsionen am Gehörgang und der Zymbaldrüse der Ratte, können diese Erkenntnis nicht bestätigen. Sie konnten im Epithel selbst während der Regeneration keine Aktivität der alkalischen Phosphatase feststellen. Im subepithelialen Gewebe war dagegen eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase zu finden.

Die Aktivität der sauren Phosphatase, nimmt mit zunehmender Differenzierung der hornproduzierenden Tumorzellen zu. Sie zeigte eine erheblich gesteigerte Aktivität in Nekrosen benachbarten Zelltrümmerbezirken (sPh-Festsetzung durch Zerstörung der Lysosomen) und in desquamierten Hornzellen. Eine Rolle der sauren Phosphatase bei der Lyse von Zellorganellen muß diskutiert werden.

Matsumara (1966) weist eine hohe Aktivität der sauren Phosphatase in desquamierten Cystenwandzellen nach; in verhornten Plattenepithelzellen des Tumors konnte diese Behauptung nicht aufrecht erhalten werden. Ob der positive Nachweis der sauren Phosphataseaktivität tumorspezifisch oder eine Folge des beginnenden Zelltodes ist, kann nicht gesagt werden.

Der Befund der positiven sauren Phosphatase in Tumorzellen deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen von R. G. I. Willighagen (1970), der besonders in Plattenepithelkarzinomen der menschlichen Haut und in Adenokarzinomen eine positive saure Phosphatase-Reaktion feststellte.

Im verhornenden und nicht verhornenden Plattenepithelkarzinom fehlten die Aktivität von ATPase und Succinatdehydrogenase.

Matsumara (1966) beobachtete ebenfalls, daß die SDH-Aktivität in Plattenepithelkarzinomzellen deutlich abgeschwächt war und in verhornenden Tumorzellen vollkommen fehlte.

Das Enzymmuster der übrigen Enzyme, außer der ATPase, die bei der direkten Kanzerogenese des früheren Stadiums IV verstärkt auftrat, war in abgeschwächter Form anzutreffen.

Gelegentlich war in umschriebenen Zellbezirken von verhornenden Plattenepithelkarzinomen eine erhöhte Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Reaktion anzutreffen. Dies könnte auf eine erhöhte Mitoserate in diesen Bezirken hinweisen.

Diese Hypothese kann diskutiert werden, da die G-6-PDH eine wichtige Rolle im Pentose-phosphat-Zyklus spielt (Karlson, 1967). Dieser Zyklus stellt einen Weg für die Oxidation von Glukose und für die Nukleotidsynthese im Zellstoffwechsel dar.

b) MORPHOLOGISCHE ERGEBNISSE

Das erste lichtoptisch faßbare maligne Transformationsstadium in der mit trans-4-Dimethylaminostilben kanzerisierten Zymbaldrüse der Ratte, war eine Basophilie des Zytoplasmas und der Zellkerne, in deren Gefolge Hyperchromasie und eine mäßige Vergrößerung der Zellkerne auftraten.
Tawfic (1965) berichtet über gleiche histologische Veränderungen. Nach unseren Beobachtungen traten diese Alterationen bei der direkten Karzinogenese im Stadium IIb auf. Aus diesen atypischen Zellbezirken entwickelt sich über die Stadien III und IV das Carcinomata in situ mit allen für die Praeneoplasien typischen Merkmalen. Das Endstadium dieser Transformation ist das invasiv wachsende Karzinom mit charakteristisch veränderter Morphologie.
Kunze (1974) beschrieb eine ähnliche Abstufung der malignen neoplastischen Proliferation, ausgehend von Harnblasenpapillomen der Ratte, induziert durch DBNA.

Für die Hyperplasio-Karzinogenese sprechen die Beobachtungen von Schardein und Kaump (1966), die als erste histologisch faßbare Veränderungen in der Zymbaldrüse der Ratten adenomatöse Knoten in zystisch erweiterten Ausführungsgängen feststellten. Da sie diese Zysten hauptsächlich bei älteren Tieren fanden, betrachteten sie dies als einen "prädisponierenden Faktor" der neoplastischen Proliferation.
Wir konnten dagegen bei älteren, nicht kanzerisierten Tieren generell keine zystischen Erweiterungen an den Ausführungsgängen der Drüse auffinden.
S. C. Skoryna und Mitarbeiter (1951) führen die Tumorentstehung, an mit 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) kanzerisierten Ratten, allein auf diese zystischen Veränderungen zurück. Die Entwicklung dieser Veränderungen, nach Zawisch-Ossenitz (1933) "zystische Degeneration",

scheint aber nicht nur auf der Wirkung von 2-AAF zu beruhen, eindeutig ist aber die Entstehung der Karzinome aus diesen "zystischen Degenerationen".
J.O. Laws et al. (1955) vertritt nicht die Ansicht Skorynas, daß die Tumoren stets aus Cystenepithel hervorgehen. Nach seiner Darstellung haben sie anscheinend ihren Ursprung vornehmlich in normalen Drüsenlobuli.

Spontantumoren des Gehörgangs und seiner Anhangsgebilde an den von uns verwendeten Tieren können durch die Untersuchungen von I. F. Herrmann und A. Schauer (1974) an 2700 unbehandelten Wistarratten mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei verschiedenen anderen Stämmen konnten besonders an älteren Tieren Spontantumoren beobachtet werden (W. F. Dunnung et al., 1945; A. Tannenbaum et al., 1962; K. C. Snell, 1965; J. L. Schardein und D. H. Kaump, 1966).
Bei der Klassifizierung der Tumoren fanden wir zu Beginn des Versuchs, in Übereinstimmung mit Pliss (1973), hauptsächlich sog. Mixed-type-Karzinome, nach Pliss: Talgdrüsen-Plattenepithelkarzinome. Mit Fortschreiten des Versuchs entstanden überwiegend verhornende Plattenepithelkarzinome. Diese Tatsache beobachtete auch J.O. Laws et al. (1955) an 2-AAF kanzerisierten Zymbaldrüsen der Ratte. Tawfic (1965) beschrieb bei trans-4-Dimethylaminostilben kanzerisierten Ratten zunächst verhornende Plattenepithelkarzinome, erst gegen Ende des Experiments konnte er Tumoren mit dazwischengelagerten talgzellähnlichen Zellverbänden diagnostizieren.

Einige Tiere zeigten im späten Stadium der Kanzerisierung Tumoren am oberen und unteren Augenlid und am Mundwinkel. Der histologische Befund ergab, daß die Tumoren an den Augenlidern von den Meibohmschen Talgdrüsen, die der Mundwinkel von den labialen Talgdrüsen ausgingen. Histologisch zeigten diese Neoplasien die selben charakteristischen Merkmale wie die der Zymbaldrüse.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Verabreichung von trans-4-Dimethylaminostilben, bis zu einer maximalen Gesamtdosis von 170 mg/kg Körpergewicht, an 300 männlichen Wistarratten, über einen Zeitraum von 170 Tagen, wurden neoplastische Alterationen an den Zymbaldrüsen induziert und histochemisch sowie morphologisch ausgewertet.

Aufgrund dieser Ergebnisse fanden wir, daß die Neoplasien aus zwei Formen der Karzinogenese hervorgingen: Bei der direkten Karzinogenese entstanden die Tumoren aus Zellen des späten Stadiums IV, bei der Hyperplasio-Karzinogenese aus Hyperplasien im Stadium I - IV, IV und aus Zysten des Stadiums IV, die morphologisch an Plattenepithelzellen erinnerten.

Folgende Differenzierungsformen von Karzinomen konnten beobachtet werden, es sind die wichtigsten aufgezählt:

Verhornende Plattenepithelkarzinome, Mixed-type-Karzinome, undifferenzierte Karzinome, nicht verhornende Plattenepithelkarzinome, nicht verhornende kleinzellige (Basalzell-) Karzinome.

Enzymhistochemisch fiel auf, daß mit zunehmender Differenzierung der hornproduzierenden Tumorzellen die Aktivität der sauren Phosphatase zunahm, ebenso in nekrotischen Zellbezirken.

Ein Zusammenhang mit diesen Abläufen wird vermutet. Im Verhornenden Plattenepithelkarzinom und Mixed-type-Karzinom konnten Sudan-III-positive Zellen ermittelt werden. Anhand dieser Talgproduktion lassen sich bedingt Rückschlüsse auf das Ausgangsstadium ziehen. Inwieweit es sich hier um eine Talgproduktion bzw. um eine atypische Hornproduktion handelt, wird diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSEN, R. A.; M. ENOMOTO; E. C. MILLER and J. A. MILLER:
Carcinogenesis and Inhibition of the Walker 256 Tumor in the Rat by trans-4-acetylaminostilben, its N-Hydroxy-Metabolite, and Related Compounds.
Cancer Res. 24, 128-143 (1964)

BALDWIN, R. M. and W. R. D. SMITH:
N-Hydroxylation in Aminostilbene Carcinogenesis.
Brit. J. Cancer 19, 433 (1965)

BEST, F.:
Über Karminfärbung des Glykogens und der Kerne.
Zschr. wiss. Mikrosk. 23, 319 (1906)

BIELSCHOWSKY, F.:
Tumors Produced by 2-Anthramine.
Brit. J. Exp. Path. 27, 54 (1946)

BRAUN-FALCO, O.:
Die Histochemie der Haut
Aus: H. A. Gottron und W. Schönfeld (Hrsg.) Dermatologie und Venerologie Bd. I/1
Thieme Verlag, Stuttgart 1961

DADDI, F.:
In: B. Romais Mikroskopische Technik
R. Oldenbourg Verlag, München-Wien, S. 1048, 256 (1968)

DRUCKREY, H.; R. PREUSSMANN, D. SCHMÄHL und M. MÜLLER:
Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten mit N, N-Dibutylnitrosamin.
Naturwissenschaften 49, 19 (1962)

DRUCKREY, H.; D. SCHMÄHL; W. DISCHLER und A. SCHILDBACH:
Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung.
Naturwissenschaften 49, 217-228 (1962)

DRUCKREY, H.; D. SCHMÄHL und W. DISCHLER:
Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei der Krebserzeugung durch 4-Dimethylaminostilben bei Ratten.
Zeitschrift für Krebsforschung 75, 209-220 (1971)

DUNNING, W. F.; M. R. CURTIS and M. E. MAUN:
Spontaneous Malignant Mixed Tumors of the Rat and the Successful Transplantation and Separation of Both Components from a Mammary Tumor.
Cancer Res. 5, 644-651 (1945)

GEYER, R. P.; V. R. BLEISCH; J. E. BRYANT; A. N. ROBBINS; J. M. SASLAW and F. T. STARE:
Tumor Production in Rats Injected Intravenously with Oil Emulsions Containing 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene.
Cancer Res. 11, 474-478 (1951)

GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode.
Histochemie 1, 48-96 (1958)

GRUNDMANN, E. und D. STEINHOFF:
Leber- und Lungentumoren nach 3,3'-Dichlor-4,4'-Diaminodiphenylmethan bei Ratten.
Z. Krebsforschung 74, 28-39 (1970)

GRZYCKI, S. et G. RZESZOWSKA:
Activite de la dehydrogenase de l'acide lactique (LDH) et de la dehydrogenase glucose-6-phosphate (G-6-PDH) dans l'epithelium de la vesicule biliaire de la grenouille (Rana esculenta)
Z. mikr.-anat. Forsch. 76, 546 (1967)

HADDOW, A.; R. I. C. HARRIS; G. A. R. KON; F. R. S. ROE and E. M. F. ROE:
The Growth-inhibitory and Carcinogenic Properties of 4-Aminostilbene and Derivates.
Phil. Trans. of the Royal Soc. of Londo No. 830, Vol. 241, 147-195 (1948)

HERRMANN, I. F.: Frühveränderungen der Karzinogenese im oberen Respirationstrakt und am äußeren Gehörgang mit seinen Anhangsgebilden. Tierexperimentelle Untersuchungen.
Habilitationsschrift, München (1974)

HERRMANN, I. F. und A. SCHAUER:
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kanzerogenese der Nasenschleimhaut.
Arch. koin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 202, 385-389 (1972)

HERRMANN, I. F. and A. SCHAUER:
Histochemical and Autoradiographic Studies on Cell Transformation Induced by trans-4-Dimethylaminostilbene in the Ceruminal Gland of Rats.
2. Europäischer Krebskongreß, Heidelberg 1973

HERRMANN, I. F.; A. SCHAUER und W. KAMKE:
Praeneoplastische Veränderungen des Gehörganges durch 3,3'-Dichlor-4,4'-diaminodiphenyläther.
Naturwissensch. 60, 2, 109 (1973)

HOLT, S. J. and R. F. J. WITHERS:
Cytochemical Localisation of Esterases Using Indoxyl-derivates.
Nature 170, 1012 (1952)

HUEBNER, R. and G. J. TODARO:
Oncogenesis of RNA Tumor Viruses as Determinants of Cancer.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 1087-1094 (1969)

HUEBNER, R. and G. J. TODARO:
The Viral Oncogenese Hypothesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1009 (1972)

JACOB, F. and J. MONOD:
Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins.
J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)

KAMKE, W.: Morphologische, histochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Kanzerisierung des Gehörgangs der Ratte durch 3,3'-Dichlor-4,4'-diaminodiphenyläther sowie trans-4-Dimethylaminostilben.
Dissertation, München 1974

KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
237-238 (1967)

KÜRZL, R. G.: Morphologische, enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen zur Cancerogenese an der Nasenschleimhaut der Ratte, induziert durch 1,4-Dinitrose-piperazin.
Dissertation, München 1974

KUNZE, E. und A. SCHAUER:
Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen an Dibutylnitrosamin-induzierten Harnblasenpapillomen der Ratte.
Z. für Krebsforsch. 75, 146 (1971)

LAWS, J. O.; G. RUDALLI, R. ROGER und P. MABILLE:
The early Changes Produced in the Auditory Sebaceous Gland (Zymbal's Gland) of the Rat by 2-Acetylaminofluorene.
Cancer Res. 15, 139 (1955)

MATSUMARA, R.: Enzyme Histochemistry of Experimentally Induced Tumors in the Mouse Submaxillary and Sublingual Glands During Carcinogenesis.
Gann 57, 251 (1966)

METZELER, M. und H.-G. NEUMANN:
Zur Bedeutung chemisch-biologischer Wechselwirkungen für die toxische und krebserzeugende Wirkung aromatischer Amine.
Z. für Krebsforsch. 76, 16-39 (1971)

MILLER, J. A. and E. C. MILLER:
The Metabolic Activation of Cancerogenic Aromatic Amines and Amides.
Progr. exp. Tumor res. 11, 273-301 (1969)

NACHLAS, M. M.; D. T. CRAWFORD; T. P. GOLDSTEIN and A. M. SELIGMAN:
The Histochemical Demonstration of Cytochromic Oxidase with a New Reagent from the Nadi Reaction.
J. Histochem. Cytochem. 5, 264 (1957)

NEUKIRCH, P.: Über eine Methode der Glykogenfixation.
Zbl. Path. 20, 531-533 (1909)

NEUMANN, H. G.; M. METZELER; J. BACHMANN und C. THOMAS:
Zur Bedeutung chemisch-biologischer Wechselwirkungen für die toxische und krebserzeugende Wirkung aromatischer Amine. I. Krebserzeugende Wirksamkeit einiger 4-Aminostilben- und 4-Aminobibenzyl-Verbindungen.
Z. Krebsforsch. 74, 200 (1970)

PLISS, G. B.: Tumors of the Auditory Sebaceous Glands. Aus: Pathology of Tumors in Laboratory Animals. Vol. I. Tumors of the Rat, Part 1. Ed in Chief: V. S. Turusow. International Agency for Research on Cancer. Lyon 1973

RATH, F. W. und L. OTTO: Zir histochemischen Darstellung der ß-Glucuronidase. Acta histochemica 25, 355-326 (1966)

RJOSK, H. K. und H. G. NEUMANN: Zur Bedeutung chemisch-biologischer Wechselwirkungen für die toxische und krebserzeugende Wirkung aromatischer Amine. II. Verteilung der Radioaktivität nach Applikation des Tritiummarkierten Carcinogens trans-4-Dimethylaminostilben und 4-Dimethylaminobibenzyl in der Ratte. Z. Krebsforsch. 75, 209-220 (1971)

ROSA, C. G. and K. C. TSOU: Use of Tetrazolium Compounds in Oxidative Enzyme-, Histo- and Cytochemistry. Nature, 192, 990 (1961)

ROSIN, A. and M. RACHMILEWITZ: The Development of Malignant Tumors of the Face in Rats after Prolonged Treatment with Thiourea. Cancer Res. 14, 494-496 (1954)

ROSIN, A. and. H. UNGAR: Malignant Tumors in the Eyelids and the Auricular Region of Thiourea-treated Rats. Cancer Res. 17, 302-305 (1957)

RUDOLPH, G. und H. J. KLEIN: Histochemische Darstellung und Verteilung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in normalen Rattenorganen. Histochemie 4, 238-251 (1964)

CARPELLI, D. G.; R. HESS and A. G. E. PEARSE: The Cytochemical Localisation of Oxidative Enzymes. I. Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 747 (1958)

SCHARDEIN, J. L. and D. H. KAUMP:
Auditory Canal Structures in Rats as Altered by Aging and by the Administration of Tris-(p-aminophenyl) carbonium Pamoate.
Cancer Res. 26, 1625 (1966)

SCHAUER, A. und E. KUNZE:
Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 70, 252-266 (1968)

SNELL, K. C.: Spontaneous Lesions of the Rat.
Aus: Ribelin, W. E. and J. R. McCoy (Eds.), The Pathology of Laboratory Animals.
Charles C. Thomas Publ. 1965

SPITZ, S.; W. H. MAGUIGAN and K. DOBRINER:
The Carcinogenic Action of Benzidine.
Cancer 3, 789 (1950)

STEINHOFF, D. und E. GRUNDMANN:
Cancerogene Wirkung von 3, 3'-Dichlor-4, 4'-diaminodiphenyläther bei Ratten.
Naturwissenschaften 4, 215 (1969)

STUTTE, H. J.: Hexozotiertes Triamino-Tritolyl-Methanchlorid (Neufuchsin) als Kupplungssalz in der Fermenthistochemie.
Histochemie 8, 327 (1967)

TANNENBAUM, A.; S. D. VESSELINOVITCH; C. MALTONI and D. S. MITCHELL: Multipotential Carcinogenicity of Urethan in the Sprague-Dawley Rat.
Cancer Res. 22, 1362 (1962)

TAWFIC, H. N.: Studies on Ear Duct Tumors in Rats. Part I: Indicence and Pathogenesis of 4-Dimethylaminostilbene-induced Tumors in Donryu Rats.
Acta path. jap. 15, 247 (1965)

UNGAR, H. and A. ROSIN:
The Histogenesis of Thiourea-induced Carcinoma of the Auditory Duct Sebaceous (Zymbal's) Glands in Rats.
Arch. de Vecchi per l'anatomica e la medicina clinica 31, 417-430 (1960)

WACHSTEIN, M. and E. MEISEL:
Histochemistry of Hepatic Phosphatases of a Physiologic pH.
Am. J. Clin. Path. 27, 13 (1957)

WILSON, R. H.; F. DeEDS and A. J. COX:
The Toxicity and Carcinogenetic Activity of 2-Acetylaminofluorene.
Cancer Res. 1, 595-608 (1941)

YAMAGIWA, K. and K. ICHIKAWA:
Experimental Study of Pathogenesis of Carcinoma.
J. Cancer Res. 3, 1 (1918)

ZAWISCH-OSSENITZ, C.:
Das Talgdrüsenorgan des Gehörgangs von Nagern und Insektivoren.
Z. f. mikr.-anat. Forsch. 33, 625 (1933)

ZYMBAL, W. E.: Histologische und experimentelle Untersuchungen am Epithelgewebe der Talgdrüsen (Gehörgangsdrüse der Ratte).
Z. f. Zellforsch. u. mikr. Anat. 18, 596 (1933)

VII. LEBENSLAUF

Am 14.12.1945 wurde ich, Helmar Schuldenzucker, als Sohn des Dipl. Ing. Emil Schuldenzucker und seiner Ehefrau Anne, geb. Weiß, in Grassau/Chiemgau geboren.
Von 1952-1957 besuchte ich dort die Volksschule. Anschließend trat ich in die Frühlings-Oberrealschule in München ein. 1958 wechselte ich auf die Oberrealschule in Marquartstein über und ab 1960 besuchte ich das Ludwig-Thoma-Gymnasium in Prien am Chiemsee. Im Juli 1966 legte ich dort die Reifeprüfung ab.
Nach Ableistung von zwei Jahren Wehrdienst bei der Bundeswehr, studierte ich zwei Semester Maschinenbau an der TU-München.
Im Herbst 1969 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Universität München. Das Vorphysikum bestand ich im Oktober 1970, das Physikum im April 1872 und das zahnärztliche Staatsexamen im Februar 1975.
Im Januar 1976 trat ich als Assistent in eine zahnärztliche Praxis ein und seit Februar 1978 bin ich in eigener Praxis tätig.

Helmar Schuldenzucker